



Universidad de Cuenca



“UNIVERSIDAD DE CUENCA”

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*”.

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO.**

AUTORAS:

DANIELA ELIZABETH CALDERÓN CEVALLOS.

ANA ISABEL GUERRERO RICAURTE.

DIRECTOR:

DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PHD.

CUENCA – 2013



RESUMEN

La utilización de sustancias naturales para el control microbiano es una de las áreas de estudio que está en aumento, entre esas sustancias están los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas.

En el presente trabajo se determinó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y de sus respectivas fracciones extraídos de *Lepechinia rufocampii* (Salvia gateada) y *Minthostachys tomentosa* (Poleo grande) sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* causantes de múltiples enfermedades de transmisión alimentaria.

Los aceites esenciales respectivamente se obtuvieron por medio de una destilación por arrastre de vapor con una trampa tipo Clevenger. Las fracciones del aceite esencial con positividad antibacteriana se obtuvieron sometiendo al aceite a cromatografía en columna y de capa fina.

En cuanto al análisis microbiológico, se utilizó un screening por medio de la llamada técnica de microdilución en placa, la misma que nos permite una cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se encuentra basada en el crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones tanto del aceite esencial obtenido como el de sus fracciones.

Las concentraciones mínimas inhibitorias al 50% y 90% (CMI 50 Y CMI 90), fueron los indicadores de la actividad antibacteriana, determinados mediante dicha técnica.

Los resultados obtenidos, revelan que tanto el aceite esencial de *Mitostachis tomentosa* (Poleo grande), como ciertas fracciones obtenidas del mismo presentan actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (220 – 470 µg/mL) y *Salmonella typhimurium* (320 – 776 µg/mL).

Palabras claves:

Salmonella tiphyurium - *Escherichia coli* - *Lepechinia rufocampii* - *Minthostachys tomentosa* - Aceites Esenciales - Efecto Antibacteriano - Monoterpenos y Sesquiterpenos



ABSTRACT

The use of natural substances for microbial control is one of the areas of study that is growing among these substances are essential oils from different plants. In this study we investigated the antibacterial activity of essential oils and their fractions extracted from *Lepechinia rufocampii* (Salvia Gateada) and *Minthostachys tomentosa* (Pennyroyal large) on bacterial strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* causing multiple foodborne diseases.

Essential oils respectively were obtained through a by steam distillation with a Clevenger type trap. Essential oil fractions with positive antibacterial oil were obtained by subjecting to column chromatography and thin layer chromatography . As microbiological analysis, we used a screening through microdilution called plaque, which allows us to a quantification of the minimum inhibitory concentration (MIC) , which is based on the bacterial growth in the presence of various thus concentrations of the essential oil obtained as its fractions.

The minimum inhibitory concentrations 50% and 90% (MIC 50 and MIC 90) were the indicators of antibacterial activity, determined by this technique.

The results obtained show that both the essential oil *Mitostachis tomentosa* (Poleo large), as certain fractions obtained from the same antibacterial activity against *Escherichia coli* (220-470 mg / mL) and *Salmonella typhimurium* (320-776 mg / mL).

Keywords:

Salmonella typhimurium - *Escherichia coli* - *Lepechinia rufocampii* - *Minthostachys tomentosa* - Essential Oils - Antibacterial effect - Monoterpenes and Sesquiterpenes



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. PLANTAS DE ESTUDIO	14
1.1.1. <i>Lepechinia rufocampii</i>	14
1.1.2. <i>Minthostachys tomentosa</i>	15
1.2. ACEITES ESENCIALES	16
1.2.1. Características.....	16
1.2.2. Distribución	17
1.2.3. Localización	17
1.2.4. Estructura y Clasificación	17
1.2.4.1. Composición.....	17
1.2.4.2. Clasificación	18
1.2.5. Aplicaciones y usos	18
1.2.6. Formas de uso.....	19
1.3. AGENTES BACTERIANOS	19
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	19
1.3.2. <i>Salmonella typhimurium</i>	21
2. MATERIALES Y METODOS.....	23
2.1. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA.....	23
2.1.1. Metodología.....	23
2.2. DESTILACION POR ARRASTRE DE VAPOR:.....	24
2.2.1. Metodología	24
2.3. DENSIDAD.....	25
2.3.1. Metodología	25
2.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES	27
2.4.1. Metodología	27
2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	28
2.5.1. Metodología	28
2.5.1.1. Preparación del Aceite Esencial.....	28
2.5.1.2. Microorganismos de Prueba.....	28
2.5.1.3. Preparación de los medios de cultivo	28



2.5.1.3.1. Caldo Mueller Hinton.....	28
2.5.1.4. Cultivo Overnight.....	28
2.5.1.5. Preparación del Inóculo.....	29
2.5.2. Screening	29
2.6. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	30
2.6.1. Metodología.....	30
2.7. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	32
2.7.1. Metodología.....	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Obtención y caracterización inicial de los aceites esenciales de <i>M. tomentosa</i> y <i>L. rufocampii</i>	35
3.2. Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales.	36
3.3. Purificación del aceite esencial de <i>M.tomentosa</i>	42
3.4. Efecto antibacteriano de las fracciones del aceite esencial de <i>M.tomentosa</i>	45
4. CONCLUSIONES.....	52
5. RECOMENDACIONES.....	53
ANEXOS	54
ANEXO 1: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE EXTRACTOS	55
ANEXO 2: PROCEDIMIENTO PARA LA CROMATOGRAFIA DE GASES.....	56
ANEXO 3: Procedimiento para el Screening.....	57
ANEXO 4: PROCEDIMIENTO PARA LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.	59
BIBLIOGRAFÍA	60



Universidad de Cuenca



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Ana Isabel Guerrero Ricaurte, autor de la tesis "**Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium***", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de Octubre del 2013

—Ana Isabel Guerrero Ricaurte

0105773741

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



Universidad de Cuenca

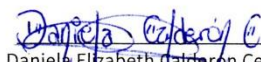


UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Daniela Elizabeth Calderón Cevallos, autor de la tesis "**Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium***", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de "Bioquímica Farmacéutica". El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 22 de Octubre del 2013


Daniela Elizabeth Calderón Cevallos

010404491-2

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



Universidad de Cuenca



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Ana Isabel Guerrero Ricaurte, autor de la tesis "**Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium***", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de "Bioquímica Farmacéutica". El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 22 de Octubre del 2013

Ana Isabel Guerrero Ricaurte

0105773741

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



Universidad de Cuenca



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Daniela Elizabeth Calderón Cevallos, autor de la tesis "Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de Octubre del 2013


Daniela Elizabeth Calderón Cevallos

010404491-2

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



DEDICATORIA

En primer lugar a Dios por haberme dado la vida y ser la persona que soy, a mis padres Galo y Eulalia por su sacrificio, palabras de aliento cuando sentía desfallecer, por su apoyo incondicional ante todos los momentos buenos y desagradables, a mis hermanos Galo y Pedro por sus fuerzas para seguir adelante, a mis sobrinos que llegaron a ser unos ángeles en mi vida y una luz en mi camino, a mi abuela Violeta y tía abuela Gladys por siempre estar junto a mí y ser una fortaleza más, a mi enamorado Jandry por su paciencia y comprensión ante todos los momentos difíciles en este largo trayecto, y a mis amigos que igual fueron un pilar muy importante para llegar a cumplir esta meta.

Ana Isabel

De mi parte esta tesis va dedicada principalmente a Dios por haberme brindado la oportunidad y sabiduría para poder culminar una parte importante de mis estudios como es la universidad, a mis padres Abdón e Hilda por ser los pilares fundamentales de mi vida, por su apoyo incondicional, por siempre darme la mano y ayudarme a salir adelante en todo momento y lo que me propongo. A mi hermana por sus consejos, a mis sobrinos por ser mi más bella razón de vivir y reír, a mi familia, amigos que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y fuerza para nunca dejarme vencer muchas gracias por estar siempre a mi lado les quiero mucho!!!..... ☺

Daniela



AGRADECIMIENTO

Iniciar una carrera profesional y terminarla de manera satisfactoria es un gran logro personal. El tener la suerte de graduarte de la universidad es un gran motivo para darle las gracias a Dios pues seguramente él también te dio una mano para lograrlo y a todos los que te apoyaron durante todo este tiempo, familiares, amigos y todos los que de una forma u otra han pasado por nuestras vidas.

De una manera muy especial queremos agradecerle a nuestro Director de tesis Dr. Fabián León Tamariz PhD, quien en primera instancia aceptó llevar este proyecto brindándonos su amistad, apoyo, paciencia y conocimientos para salir con éxito a lo largo de este trayecto.

A la directora del proyecto Vllir de plantas medicinales Dra. Isabel Wilches le agradecemos por abrirnos las puertas, brindarnos apoyo y permitirnos realizar nuestro tema de tesis en las distintas instalaciones del proyecto.

También, queremos agradecer a quienes forman parte del proyecto VLIR en el área de plantas medicinales, de una forma especial, a las Dras. Lourdes Jerves y Nancy Cuzco, que siempre estuvieron junto a nosotras para ayudarnos y aclarar dudas con respecto a nuestro proyecto.

Al Dr. Manuel Vega de igual manera gracias por su ayuda, comprensión y sobre todo amistad, por otra parte, queremos agradecer a Andrea Abril por haber sido una guía en nuestro trabajo, por la paciencia y la ayuda que siempre nos ofreció en todo momento.

Gracias a todos.



CAPÍTULO I



1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es considerado como el país con mayor biodiversidad biológica por unidad de área en América Latina, es decir posee una variabilidad de formas de vida como un conjunto de genes, especies y ecosistemas. Esta diversidad es el resultado de las cambiantes condiciones ambientales a lo largo de millones de años. Los factores que favorecen esta amplia biodiversidad son por mencionar algunos la Cordillera de los Andes que da origen a diversos pisos longitudinales cada uno con su microclima.

Los páramos Ecuatorianos con su diversidad única hace que nuestro país sea considerado uno de los 17 países mega diversos del mundo. ⁽¹⁾

La flora del Ecuador cuenta con más de 16.000 especies de plantas vasculares de las cuales 5.172 son útiles y de estas 3.118 son usadas con fines medicinales de las cuales un 75% de estas son especies nativas y un 11% corresponde a plantas que han sido introducidas. ⁽²⁾

Por tal motivo nuestro país es elegido por numerosos grupos de investigadores que realizan estudios tanto en química y farmacología de productos naturales en base a plantas medicinales, las cuales son pertinentemente utilizadas como materia prima para la producción de extractos o el aislamiento de sustancias naturales puras. ⁽³⁾

El Ecuador presenta altos índices de morbilidad relacionados a problemas gastrointestales causados por diferentes microorganismos los cuales producen diferentes patologías como son: las enfermedades diarreicas agudas que se encuentran en un segundo lugar, seguido de la salmonelosis que ocupa un décimo lugar. ⁽⁴⁾



Es por eso que en nuestro plan de trabajo nos basamos en analizar la posible actividad antibacteriana que pueden presentar los extractos naturales (aceites esenciales) de *Lepechinia rufocampii* y *Mitostachis tomentosa* ante las diferentes cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella tiphymurium*, ya que se han encontrado artículos que reportan estudios similares en plantas del mismo género.

1.1. PLANTAS DE ESTUDIO

El estudio de plantas en el Ecuador es un interesante proyecto el cual constituye un avance significativo dentro del conocimiento de la flora de la región, considerando que el 80% de nuestra población las ha utilizado como una fuente de medicina tradicional.

Para desarrollar la presente investigación se ha considerado dos especies pertenecientes a la familia Lamiaceas siendo estas: *Lepechinia rufocampii* (Salvia) y *Minthostachys tomentosa* (Poleo).

1.1.1. *Lepechinia rufocampii*

El género ***Lepechinia*** pertenece a la familia ***Lamiaceae*** la cual presenta por lo menos 38 especies. Se las encuentra en las montañas a una altura de 1600 – 3800 metros sobre el nivel del mar. Siendo este un arbusto aromático, de color verde, los tallos presentan una altura de 20 a 40 cm de largo, las hojas son elongadas, deltoides, agudas teniendo cada una de estas un largo de 4 a 6 cm de largo por 2 cm de ancho. La superficie superior es rugosa, se puede encontrar peciolo en las partes basales de las hojas y tienen una dimensión de 6cm de largo. ⁽⁵⁾

El uso tradicional de esta especie acapara varios ámbitos entre esos encontramos contra las afecciones gástricas e intestinales concretamente contra sus procesos inflamatorios, también es útil en la inflamación de las vías respiratorias, tos y tuberculosis, de igual manera se le atribuyen propiedades cordiales, tónicas,



estimulantes, diuréticas, antiespasmódicas y reguladoras de las funciones menstruales. Se le ha utilizado de igual manera contra la excesiva transpiración especialmente la nocturna producida por fiebres altas debido a la presencia de **tuyona** (compuesto con estructura similar al alcanfor formado por una cetona y un monoterpeno presente en el aceite esencial) que bloquea las terminaciones nerviosas de las glándulas. ⁽⁵⁾

Externamente se le ha utilizado para inflamaciones de la cavidad bucal y garganta, en gargarismos para angias, dolor de muelas y parodontitis. Se usa como desinfectante de la piel en afecciones de origen micótico, úlceras y llagas. Las formas de consumo reportadas son Infusión, decocción, tintura, vino entre otros. ⁽⁶⁾



Figura 1. *Lepechinia rufocampii*

1.1.2. *Minthostachys tomentosa*

Es una planta silvestre muy fragante que crece en clima frío entre 2500 – 3900 metros sobre el nivel del mar. El género ***Minthostachys*** presenta más de 25 especies, es un arbusto pequeño de follaje verde las hojas son ovaladas ligeramente pequeñas con un largo de 2.5cm y un ancho de 2cm, presenta un tallo de color verde que puede variar hasta un color amarillo, ambos lados de la hoja presenta una textura que es lisa al tacto. ⁽⁷⁾

Su uso está indicado principalmente para facilitar los procesos digestivos pues es un excelente tónico estomacal, ayuda en la hipoclorhidria, aumentando la secreción de jugos gástricos, intestinal y pancreática. Es carminativo, vermífugo,



cicatrizante, antiséptico, antiespasmódico, colagogo, aumentando la secreción de bilis, lo que ayuda con los trastornos de la vesícula biliar. Funciona como expectorante y antitusígeno, siendo buen remedio para los catarros, tos ferina y las afecciones bronquiales.

Dentro de las formas en las cuales ha sido ingerido encontramos que tomado con agua y vinagre detiene las náuseas y mezclado con miel y sal evacua la flema de los pulmones. ⁽⁸⁾



Figura 2. *Minthostachys tomentosa*

1.2. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Oficialmente, se denominan aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos.

1.2.1. Características

Los aceites esenciales generalmente son líquidos a temperatura ambiente aunque algunos solidifican a baja temperatura como por ejemplo, la esencia de anís. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados. Algunos son inflamables. Generalmente son menos densos que el agua. Los



aceites esenciales suelen ser insolubles. Son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc).

La solubilidad en el alcohol es variable y suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos. ⁽¹⁰⁾

1.2.2. Distribución

Se encuentran casi exclusivamente en vegetales superiores, concretamente en ciertas familias de Angiospermas, de las cuales cabe destacar:

- Lamiaceas: menta, melisa, poleo, salvia
- Asteráceas: manzanilla
- Lauráceas: canela
- Mirtáceas: eucalipto, clavo
- Rutáceas: cítricos
- Apiaceas: anís, hinojo ⁽¹⁰⁾

1.2.3. Localización

Los aceites esenciales se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos secretores, en canales secretores, raíz, frutos, corteza, hojas tallos, etc.

1.2.4. Estructura y Clasificación

1.2.4.1. Composición

Los aceites esenciales son generalmente mezclas complejas de varias sustancias, que a su vez se pueden tener estructuras muy diversas. La composición química de los aceites esenciales depende de varios factores como: el origen botánico (la especie y la raza química de las que proceden), el ciclo vegetal (la composición y la proporción varían según la fase del ciclo vegetativo), las condiciones ambientales, las características del cultivo (suelo, riego, abonos, etc), y el procedimiento de obtención, ya que durante el mismo se puede alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal. ⁽¹⁰⁾



1.2.4.2. Clasificación

Los compuestos presentes en los aceites esenciales se pueden clasificar en: Terpenoides y no Terpenoides.

- **Terpenoides:** Los compuestos terpénicos proceden de la condensación del isopreno (C₅) y pueden tener o no oxígeno. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos (C₁₀) y sesquiterpenos (C₁₅), que pueden ser aromáticos o alifáticos. Los que poseen oxígeno son terpenos funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter, éster o peróxido.
- **No Terpenoides:**
 - * Sustancias volátiles alifáticas: suelen ser hidrocarburos (C, H) o sustancias con función oxigenada (C, H, O).
 - * Sustancias volátiles aromáticas: con diferentes estructuras: sustancia con estructura C₆ – C₁; sustancia con estructura C₆ – C₃ (derivados del fenilpropano); derivados cumarínicos.⁽⁹⁾

1.2.5. Aplicaciones y usos

Las aplicaciones de los aceites esenciales, y de las esencias en general, son múltiples y variadas.

Se utilizan tanto por sus propiedades aromáticas, en la industria alimentaria, en perfumería y en la industria de productos de limpieza, como por sus propiedades farmacológicas, en la industria farmacéutica.

- **Antisépticos:** Frente a microorganismos gram positivos y gramnegativos e incluso frente a hongos productores de micosis y ciertas levaduras. El poder antiséptico es variable según las características estructurales de los componentes del aceite esencial, el cual puede tener:



- a) Elevado poder antiséptico: aceites que poseen componentes con un grupo fenol.
- b) Poder antiséptico medio: aceites que poseen componentes con función alcohol.
- c) Bajo poder antiséptico: aceites que poseen componentes con función cetona. ⁽¹⁰⁾

Muchos de los aceites esenciales resultan tóxicos, por lo que se debe controlar su uso y administración. Hay efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso, neurotoxicidad, convulsiones, asfixia, y otros. Algunos incluso resultan mortales.

1.2.6. Formas de uso

- 1) La droga vegetal que contiene los aceites esenciales.
- 2) Los aceites esenciales extraídos de la droga vegetal.
- 3) Los productos concretos, aislados del aceite esencial.

Usos:

- * Droga vegetal: infusión, preparados galénicos.
- * Aceites esenciales: por sus acciones farmacológicas, también como aromatizantes (correctores del sabor y aroma)
- * Productos aislados: por sus acciones farmacológicas, también como aromatizantes. ⁽¹⁰⁾

1.3. AGENTES BACTERIANOS

1.3.1. *Escherichia coli*

Es un bacilo gram negativo de flagelos peritricos, que no forma esporas tienen una dimensión de 0.5 um de ancho por 3 um de largo. Dentro de su estructura antigénica tiene una constitución polisacárida formada por un antígeno capsular termolábil (Antígeno “K”) y un antígeno somático localizado en la pared celular



(Antígeno “O”) e igualmente posee una constitución proteica la cual posee un antígeno flagelar (Antígeno “H”). Son microorganismos que dan **catalasa positiva, oxidasa negativa** y reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa a lactosa con producción de gas y son anaerobios facultativos. ⁽¹¹⁾

Presenta 5 clonas las cuales son:

- ***E. coli enteropatógeno***: Afecta la mucosa intestinal.
- ***E. coli enteroinvasiva***: Afecta a la mucosa del colón.
- ***E. coli enterohemorrágica***: Produce una colitis hemorrágica.
- ***E. coli enteroagregativa***: Caracterizada por diarrea secretora de moco y sangre.
- ***E. coli enterooxigénica***: Muy común en los países de desarrollo. ⁽¹¹⁾

Dentro de las pruebas bioquímicas producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer, incapaces de crecer en medio con citrato. Son indol positivos.

Las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua o alimentos. ⁽¹²⁾

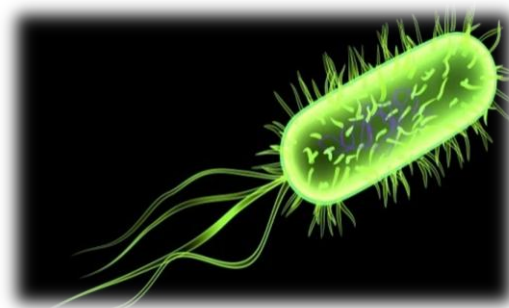


Figura 3. *Escherichia coli*

1.3.2. *Salmonella typhimurium*

Integrada por bacilos gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasas negativo y suelen ser móviles. El género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura, para *Salmonella* (Vi).

Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína- lipopolisacárido. ⁽¹³⁾ Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin). Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles.

Las Salmonelosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre.

La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas. ⁽¹³⁾

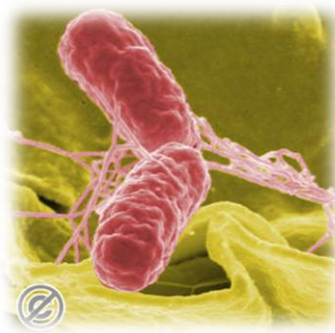


Figura 4. *Salmonella typhimurium*



CAPÍTULO II



2. MATERIALES Y METODOS

2.1. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA

2.1.1. Metodología

La metodología que utilizamos en este proceso de recolección fue:

- **Recolección:** Se realizó en el Mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca ubicado en la calle Larga y General Torres.
- **Selección:** En esta etapa se van escogiendo las mejores hojas, que estén en buen estado, frescas que no tengan ningún tipo de lesión ni se encuentren oscuras lo cual puede ser producido por la degradación de taninos.
- **Lavado:** La planta recolectada fue lavada en una corriente de agua potable, cuidando de limpiar cada hoja. Luego del lavado inicial se procedió a colocar todo el material en un recipiente plástico con agua destilada por 10 min. Pasado este tiempo se escurrió y se colocó el material en mallas de acero inoxidable sobre papel periódico sin impresión para eliminar el exceso de agua por 24 h.
- **Secado:** El material recolectado del proceso anterior es pasado a una estufa Pro 3 (Cuenca, Ecuador) a 40 °C sobre bandejas de acero inoxidable previamente sanitizadas con alcohol antiséptico. El material procesado se mantiene en esas condiciones por 24 a 48 h hasta conseguir peso constante como se muestra en la figura 5. Luego de este tiempo se pasa el material vegetal a una funda de papel y se procede a su pesaje. Se almacena en condiciones adecuadas (protegido de la luz en ambiente seco) hasta su procesamiento.



Figura 5. Planta después del proceso

Continuando con la parte práctica de la tesis el siguiente paso que realizamos fue:

2.2. DESTILACION POR ARRASTRE DE VAPOR:

2.2.1. Metodología

El experimento se basó en una destilación por arrastre de vapor mediante el uso de una trampa tipo Clevenger para aceites con una densidad menor que la del agua según lo descrito en el artículo: “Destilación por arrastre de vapor”.⁽¹⁴⁾

1. Se procede a pesar la cantidad de material vegetal necesaria para el procedimiento (100 g). El material pesado es traspasado a un balón de vidrio fondo redondo, se agrega 1 litro de agua destilada y unas canicas de vidrio para evitar posibles explosiones bruscas del material al calentarse.
2. Se arma el equipo tipo Clevenger colocando el balón con material vegetal dentro de la manta calefactora, se acopla la trampa Clevenger y el refrigerante para la condensación del aceite como se presenta en la figura 6

se conecta la manta calefactora y se espera hasta que el material vegetal comience a ebulir. A fin de controlar el proceso y evitar cualquier riesgo de explosión brusca o contaminación del producto, se sometió a series de

calentamiento consistentes en ciclos de 20 min con el equipo conectado seguidos de 5 min desconectado durante un período de tres horas.

3. Luego de este tiempo se procedió a apagar el equipo y recolectar el aceite obtenido en la trampa tipo Clevenger, cuya finalidad es para la obtención de sustancias cuya densidad sea menor que la del agua. Posteriormente se procede a colocar una mínima cantidad de sulfato de sodio el cual va absorber los posibles remanentes de agua que son arrastrados con el aceite.
4. Se centrifuga a 3.000 rpm por 5 minutos, extraemos el centrifugado con la ayuda de una pipeta pasteur pasándolo a un tubo limpio al cual se le administra una ligera corriente de nitrógeno. ⁽¹⁴⁾



Figura 6. Destilación por arrastre de vapor.

2.3. DENSIDAD

2.3.1. Metodología

- Conectamos y prendemos la balanza analítica se deja de esta manera por 15 minutos hasta que se estabilice.



- Utilizamos picnómetros de 2ml previamente secos en estufa a 35°C, se realiza una primera lectura de los picnómetros vacíos y luego una segunda lectura del picnómetro más la muestra.
- Con los datos obtenidos realizamos los cálculos para obtener la densidad.

Minthostachys tomentosa

Peso picnómetro con muestra	7,4713 g
Peso picnómetro vacío	5,7603 g
Peso de la muestra	1,711 g

$$\int \text{ — } \int \text{ — } \int$$
$$C_2 \text{ — } C_2 \text{ — }$$
$$C_2$$

Lepechinia rufocampii

Peso picnómetro con muestra	7,2852 g
Peso picnómetro vacío	5,7478 g
Peso de la muestra	1,5374 g

$$\int \text{ — } \int \text{ — } \int$$
$$C_2 \text{ — } C_2 \text{ — }$$
$$C_2$$

Dónde:

C = Concentración

V = Volumen



2.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES

2.4.1. Metodología

Para la cromatografía de gases se utilizó un equipo Agilent 6890 procedente de los Estados Unidos de Norteamérica, con un inyector en el modo Split less a una temperatura de 250°C. Con una columna polar DB5 J&W 122 – 5062 de 60 metros de largo por 250 µm de diámetro por 0,25 µm nominal, el flujo del experimento estuvo establecido en 1mL por minuto. Se utilizó un programa con una temperatura inicial de 38°C por 2 minutos; se aumentó la temperatura a razón de 10°C por minuto hasta llegar a los 160°C, temperatura que se mantuvo por 24 minutos. El detector utilizado fue del tipo FID (ionización de llama) a una temperatura de 300°C con un flujo de 36 mL por minuto.

Patrones: Se utilizaron los siguientes patrones α – pineno; β – pineno; Linalool; Menthona. Marca: Sigma – Aldrich. Procedentes de Alemania. ⁽¹⁵⁾

Una vez identificado ya cada uno de los parámetros necesarios para el análisis cromatográfico comenzamos a realizar las diferentes corridas. Como primer paso ponemos la sustancia a ser analizada con una jeringa de vidrio la cual absorbe microcantidades (0,2 µL) para ser depositadas en el inyector caliente donde se vaporiza, una pequeña cantidad de vapor se introduce en la columna donde ocurre las distintas separaciones.

A continuación se realiza la primera corrida que corresponde a la del solvente que este caso fue el hexano (solvente apolar) ya que nuestros aceites esenciales presentaron una buena miscibilidad con este. Un segundo análisis fue con cada uno de los patrones, obteniendo de cada uno de ellos su pico correspondiente. Luego se realizó una mezcla de todos los patrones juntamente con el hexano obteniendo como resultado una gráfica de todos estos agrupados. ⁽¹⁶⁾

Y por último se realiza el análisis de nuestros aceites esenciales.



2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

2.5.1. Metodología

2.5.1.1. Preparación del Aceite Esencial.

Para este ensayo se utilizó una dilución de 20 mg/mL la cual se lleva a cabo de la siguiente manera: 970 μ L de DMSO + 30 μ L de aceite esencial puro.

2.5.1.2. Microorganismos de Prueba

Para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana se emplearon 2 cepas gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*. Estas se encuentran en leche para fortificarse y proliferarse, están almacenadas en el biofrizzer.

2.5.1.3. Preparación de los medios de cultivo

2.5.1.3.1. Caldo Mueller Hinton

Medio nutritivo que favorece el crecimiento de diversos microorganismos, se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los microorganismos frente a los antimicrobianos. Puede ser suplementado para permitir el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales.⁽¹⁸⁾

2.5.1.4. Cultivo Overnight

Se retiran las bacterias del biofrizzer y se coloca en la estufa a 35°C por 15 minutos hasta que se descongelen, de igual manera se coloca placas de Tripticasa soya agar (TSA) a temperatura ambiente para poder realizar la siembra. Realizamos dentro de la cámara de flujo, tomamos 100 μ L de la cepa bacteriana y realizamos



la siembra en estría girando hasta que toda la placa quede uniforme. Incubamos a 35°C por 24 horas.

2.5.1.5. Preparación del Inóculo

El inóculo bacteriano se realizó a partir del cultivo overnight, de este cultivo se toma de 2 a 3 colonias y se depositan en un tubo con suero estéril y se compara con un patrón de Mc Farland cuyo concentración estándar sea 0,5. Esto se hace contra un fondo negro con blanco para ver si presenta la misma turbiedad.

De esto se toma 210 μL y se lleva a 10,86 mL de Caldo Mueller - Hinton para colocar en la placa.

2.5.2. Screening

Para este ensayo se emplearon las placas TC de 96 pocillos , se colocó 180 μL de caldo Mueller-Hinton en todos los pocillos de la primera fila de la placa, luego 100 μL de caldo Mueller-Hinton a todos los demás pocillos restantes, después se añadió 20 μL de la dilución previa de aceite esencial y DMSO en la primera fila de la placa, a continuación se mezcló en el primer pocillo y se realizó diluciones seriadas tomando 100 μL del primer pocillo y traspasando al siguiente pocillo, todo en dirección vertical, se realizó el mismo procedimiento hasta el último pocillo, de este último se tomaron 100 μL y se desechó quedándose así 100 μL de medio + aceite en cada pocillo.

Posteriormente se inoculo la placa con 100ul de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos de la placa a excepción de los controles de esterilidad, llegando así a un volumen final de 200ul en todos los pocillos de la placa, siendo así la concentración final de los aceites esencial de 1000 a 8 $\mu\text{g/mL}$.

Además de los controles de esterilidad se emplearon dos controles el uno positivo:

- * Gentamicina 0,65 mg/mL: 180 μ L de caldo + 20 μ L Gentamicina.
- * Negativo DMSO: 180 μ L de caldo + 20 μ L de DMSO.

Finalmente las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C por un periodo de 18-24 h. La prueba se realizara por triplicado.

Nota: Este procedimiento se realizó tanto para los aceites esenciales como de los patrones. ⁽¹⁷⁾



Figura 7. Microdilución en placa TC₉₆

2.6. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

2.6.1. Metodología

En este primer ensayo realizamos una cromatografía de capa fina (TLC), usando una fase estacionaria polar que comúnmente es una placa de sílica gel, se analizaron la muestra del aceite esencial junto con los patrones usando una fase móvil, para permitir el arrastre de cada uno de ellos a través de la sílica. La fase móvil debe tener un punto de ebullición bajo para su evaporación después de la aplicación.



Se procedió a realizar diferentes fases móviles:

- Metanol 100%.
- Metanol 85% - H₂O 15%.
- Cloroformo 50% - Metanol 50%.
- Cloroformo 50% - Hexano 50%.
- Cloroformo 100%.

El procedimiento se realiza de la siguiente manera:

1. Se coloca la fase móvil alrededor de un centímetro cubico en un frasco y se lo deja concentrar por unos cinco minutos.
2. En la placa de sílica gel se colocan dos gotas de cada muestra a una (dilución de 5 mg/mL) con la ayuda de un capilar en el siguiente orden:
 - 1 α Pineno.
 - 2 β Pineno.
 - 3 Linalol.
 - 4 Limoneno.
 - 5 Menthona.

Se espera a que se seque y se coloca la placa de una manera equilibrada para que ascienda por capilaridad la fase móvil.

3. Retiramos la placa y dejamos que se seque dentro de la cabina, para su posterior observación en UV de onda corta (254nm) identificando la separación de los distintos compuestos.
4. Revelamos a cada una de las placas con yodo por un tiempo de 15 minutos hasta que cada una de las manchas tome un color amarillento.



5. Una vez revelado con yodo, realizamos una segunda revelación con Vainillina – Ácido sulfúrico, en el cual cada una de las manchas del corrimiento tomo un color diferente. ⁽¹⁹⁾

2.7. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

2.7.1. Metodología

En una columna para cromatografía previamente sellada con lana de vidrio se colocaron 18,9g de sílica, peso establecido según la cantidad de aceite a ser analizado.

Se tomaran 1,250 mL de aceite, entonces:

$$\begin{array}{rcl} 0,6576 \text{ g/mL} & \text{—————} & 1 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 1,250 \text{ mL} \\ X = 0,947 \text{ g} & \longrightarrow & 947 \mu\text{g} \end{array}$$

Añadimos el aceite el cual se encuentra diluido con 1,250 mL de cloroformo suavemente a la columna cromatográfica y se procede a separar las fracciones empleando distintas fases móviles que comprenden:

- 60 mL de Hexano puro
- 60 mL de Hexano 75% - Cloroformo 25%
- 60 mL de Hexano 50% - Cloroformo 50%
- 60 mL de Hexano 25% - Cloroformo 75%
- 60 mL de Cloroformo puro

Se recolectaron 90 fracciones en tubos de vidrio, se eliminó el solvente a través de un concentrado al vacío RapidVap de Labconco (americano). Se re disolvieron las fracciones con 50 μ L de cloroformo y se desarrolló una nueva placa de TLC con el fin de verificar la separación. Se unieron las fracciones que mostraban igual



composición como se muestran en las figuras 8 y 9. Finalmente se procedió a eliminar el solvente obteniendo así 9 fracciones de la siguiente manera:

- **A:** Primera elución del hexano.
- **B:** Fracciones 1 – 9.
- **C:** Fracciones 10 – 23.
- **D:** Fracciones 24 – 42.
- **E:** Fracciones 43 – 47.
- **F:** Fracciones 48 – 75.
- **G:** Fracciones 76 – 80.
- **H:** Fracciones 81 – 85.
- **I:** Fracciones 86 – 89.



CAPÍTULO

III

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención y caracterización inicial de los aceites esenciales de *M. tomentosa* y *L. rufocampii*.

En el presente estudio empleando la destilación por arrastre de vapor se obtuvieron los aceites esenciales de las plantas *M. tomentosa* y *L. rufocampii*. Algunas de las características físicas de estos extractos y del rendimiento del proceso se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento del proceso de extracción y algunas propiedades físicas de los aceites esenciales obtenidos.

Planta	Peso (g)	Aceite esencial					
		Color	Olor	Apariencia	Volumen (ml)	Densidad (g/ml)	Rendimiento (ml/100g)
<i>M. tomentosa</i>	500	Amarillo	Menta	Líquido Oleoso	2,6	0,8550	0,52
<i>L. rufocampii</i>	900	Amarillo Claro	Fuerte propio de la planta	Líquido Oleoso	2,6	07687	0,29

Los aceites esenciales, recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Posteriormente pueden sufrir procesos de oxidación y tornarse de otros colores como amarillo, verde, café o incluso marrón, debido a sus constituyentes primarios, lo cual a su vez se relaciona con la planta de la que se obtenga. ⁽²¹⁾

Del mismo modo los olores dependen de los compuestos volátiles presentes en cada planta y se han descrito como fuertes, picantes y agradables, dulces y frutales, alimonados y florales, entre otros. Generalmente son líquidos oleosos a temperatura ambiente con densidades relativas menores que 1,000 g/mL. ⁽²¹⁾



Los rendimientos de estos oscilan entre 0,2% y 3% dependiendo de muchos factores sobre todo del tipo de planta y las partes que se utilizan, el estado fisiológico y elementos del procedimiento. ^{(21) (22)}

3.2. Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana el aceite de *L. rufocampii* apenas mostró efecto inhibitorio del crecimiento de *E. coli* y *S. typhimurium*. Lo contrario ocurrió con el aceite de *M. tomentosa* tal como lo demuestran sus concentraciones mínimas inhibitorias que se presenta a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. CMI50 y CMI90 de los aceites esenciales de *L. rufocampii*, *M. tomentosa* y para el disolvente y los controles positivo y negativo.

Tratamiento	<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	CMI50 (µg/ml)	CMI90 (µg/ml)	CMI50 (µg/ml)	CMI90 (µg/ml)
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Gentamicina	No registra	No registra	9,96	14,06
<i>L. rufocampii</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>M. tomentosa</i>	219,41	461,72	319,79	776,12

CMI50: Concentración a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano en un 50 %; CMI90: Concentración a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano en un 90 %; DMSO: Dimetilsulfóxido (diluyente).

El efecto antibacteriano del aceite esencial del *M. tomentosa* es dependiente de la dosis tal y como se muestra en el gráfico 1.

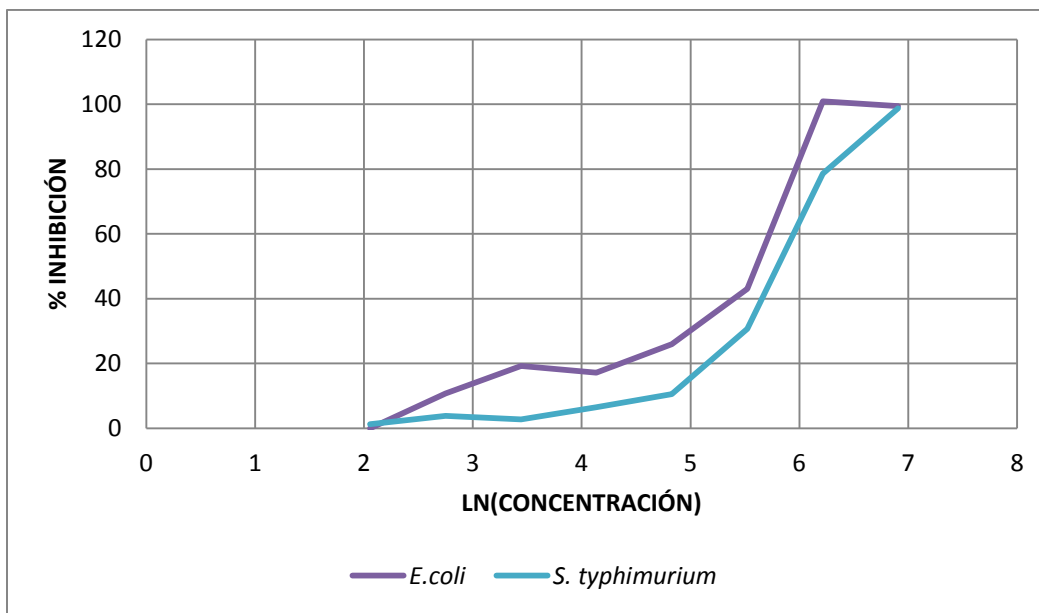


Gráfico 1. Por ciento (%) de inhibición del crecimiento de *E. Coli* y *S.typhimurium* por el aceite esencial de *M.tomentosa*.

Del mismo se aprecia un ligero desplazamiento hacia la izquierda de los resultados para *E.coli* lo que sugiere una mayor sensibilidad a los constituyentes del aceite. Tales suposiciones comprobadas al realizar las CMI50 y CMI90 del aceite para ambos microorganismos como se presenta en los gráficos 2 y 3.

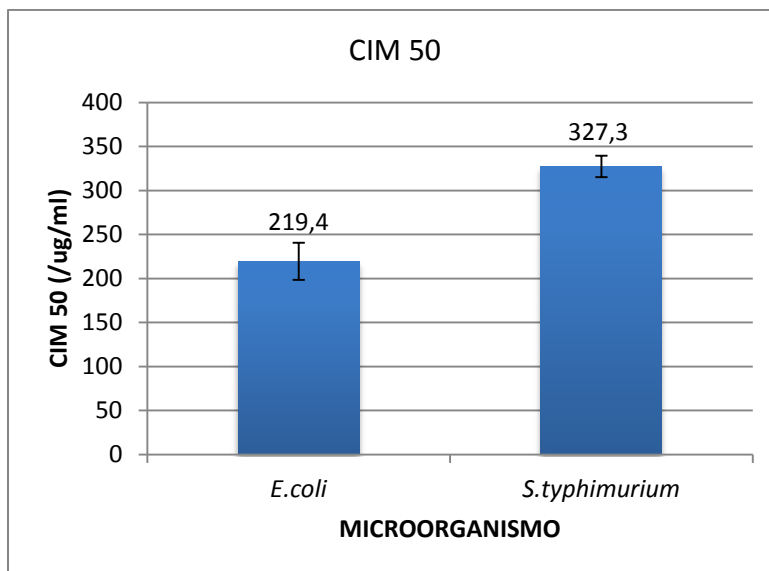


Gráfico 2. Comportamiento de la CMI50 del aceite esencial de *M.tomentosa* según el microorganismo de prueba ($P<0.01$).

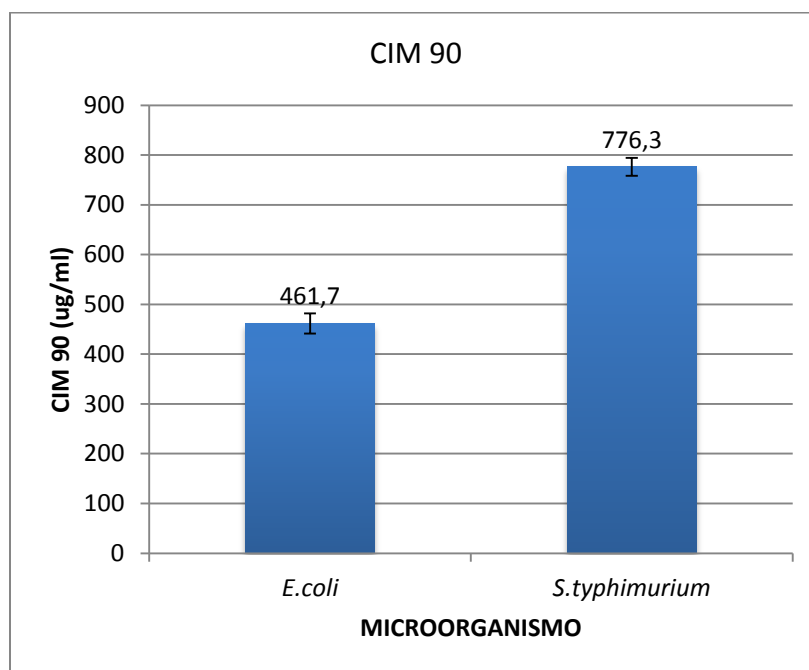


Gráfico 3. Comportamiento de la CMI90 del aceite esencial de *M.tomentosa* según el microorganismo de prueba ($P<0.01$).



Varios autores han señalado el efecto antibacteriano de las plantas del género *Minthostachys* sp. en un amplio rango de concentraciones y microorganismos evaluados. ⁽²³⁾ ⁽²⁴⁾

Los resultados encontrados en la literatura sobre la sensibilidad de *E.coli* y *S.typhimurium* frente a aceites esenciales son diversos y al parecer están relacionados con el contenido químico de estos últimos. Aún entre plantas de la misma familia, género e incluso de la misma especie, pueden encontrarse resultados diferentes, dado que existen un gran número de factores que pueden afectar su actividad biológica. No solo influye la variedad de planta y su fuente botánica, sino también su estado de desarrollo, ubicación geográfica, técnica de extracción, uso fresco de la planta o no, metodología de ensayo empleada, entre otros. ⁽²⁵⁾

La cromatografía gaseosa se realizó para evaluar las diferencias en la composición química de ambos aceites, e identificar posibles compuestos con actividad antibacteriana. En el caso de *L.rufocampii* se detectaron cerca de 200 compuestos sin embargo aproximadamente el 90 % solo se encontraba en trazas. En *M.tomentosa* se detectaron un poco más de 40 sustancias con más del 50 % a concentraciones apreciables.

Entre los compuestos identificados se encuentran: α -pineno, β -pineno, limoneno, linalool y la mentona. Las cantidades relativas de estos se presentan en la tabla 3 y figura 8:

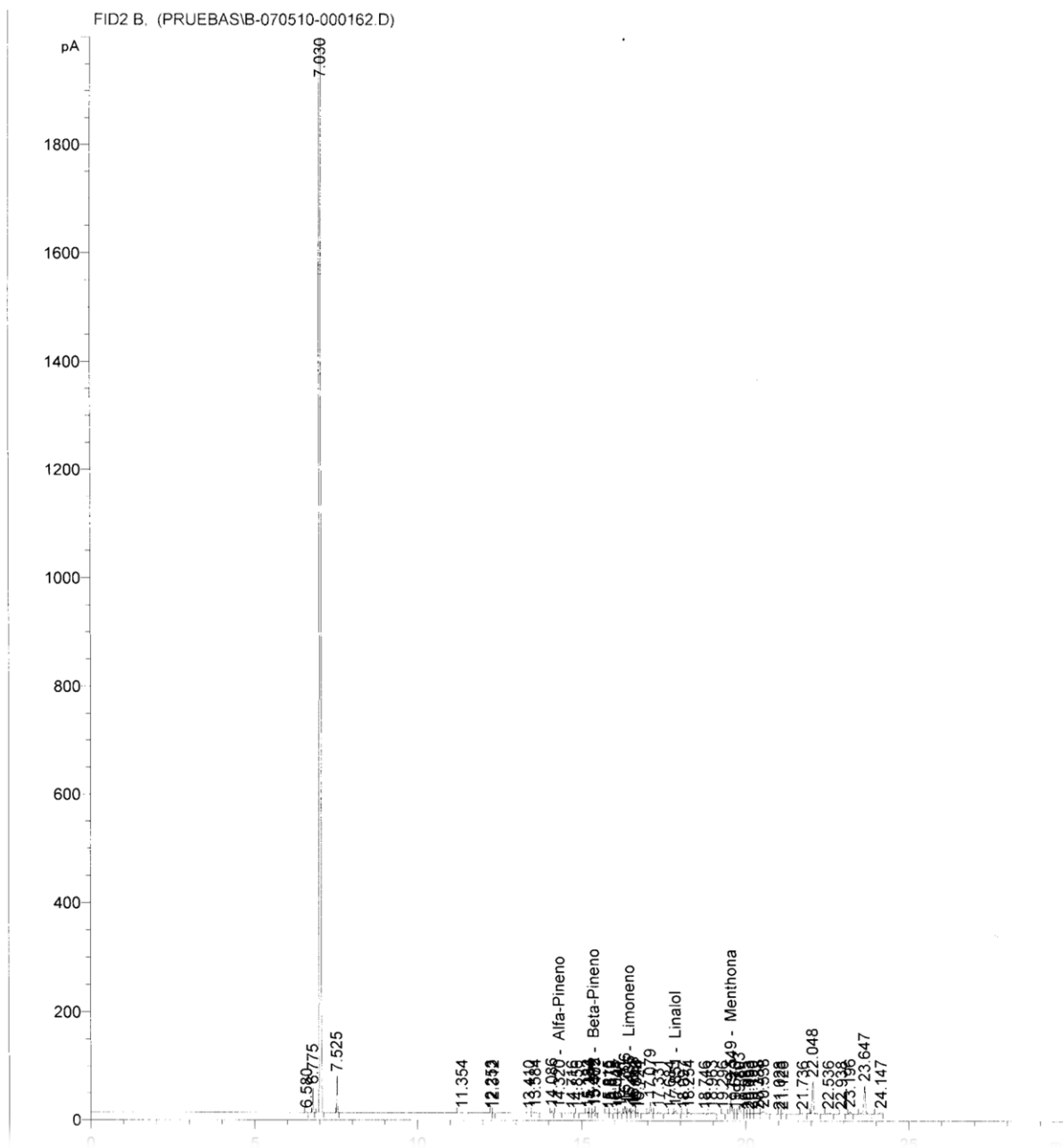


Figura 8. Cromatografía de gases de *Mitostachis tomentosa*



Tabla 3. Composición relativa de algunos compuestos volátiles en los aceites esenciales evaluados (% del total).

Compuesto	Tiempo de Retención	<i>L. rufocampii</i>	<i>M. tomentosa</i>
α-pineno	14,321	0,72	0,32
β-pineno	15,361	4,74	1,60
Limoneno	16,438	2,79	2,46
Linalol	17,859	3,34	2,08
Mentona	19,552	2,14	12,26
Total	-----	13,73	18,72

Entre los compuestos identificados el β -pineno estuvo más representado respecto en *L. rufocampii* mientras que la mentona estuvo en mayor cantidad en *M. tomentosa*. Con el objetivo de evaluar si los compuestos identificados son los causantes de la actividad antibacteriana, se desarrolló un ensayo similar al de los aceites esenciales puros frente a *E.coli* y *S.typhimurium*.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los patrones de los compuestos identificados en los aceites esenciales.

Patrón	<i>E.coli</i>		<i>S.typhimurium</i>	
	CMI50 ($\mu\text{g/ml}$)	CMI90 ($\mu\text{g/ml}$)	CMI50 ($\mu\text{g/ml}$)	CMI90 ($\mu\text{g/ml}$)
α-pineno	>1000	>1000	>1000	>1000
β-pineno	>1000	>1000	>1000	>1000
Limoneno	>1000	>1000	>1000	>1000
Linalol	698,4	915,3	664,8	933,7
Mentona	>1000	>1000	>1000	>1000

Varios estudios mostraron que los aceites ricos en α -pineno y β -pineno tenían una fuerte actividad antibacteriana no solo contra *E.coli* y *S.typhimurium* sino también



contra otros microorganismos potencialmente patógenos. ⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾ Se ha encontrado de igual manera que estos compuestos poseen la capacidad de alterar y romper la membrana bacteriana. ⁽²⁵⁾ Sin embargo algunos autores indican que esto ocurre a concentraciones muy superiores a las que se encontró en nuestros aceites esenciales. ⁽²⁷⁾

Por otro lado el linalool aparece como un posible agente antibacteriano en los aceites esenciales. En una escala de actividad, este alcohol es ubicado en una región intermedia entre el limoneno, el α -pineno y el β -pineno (de menor actividad entre los terpenos) y los alcoholes aromáticos de mayor actividad. ⁽²⁸⁾

3.3. Purificación del aceite esencial de *M.tomentosa*.

Previo a la purificación del aceite esencial de *M.tomentosa* el cual fue evaluado en diferentes disolventes para determinar cual posee mayor poder resolutivo en la mezcla de los compuestos del extracto. Los resultados más relevantes se muestran en las figuras 8 y 9.

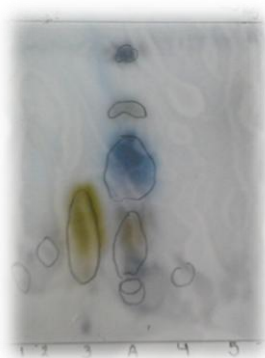


Figura 8. Cromatografía capa fina cloroformo 50% hexano 50%. A: aceite; 1 a 5 patrones.

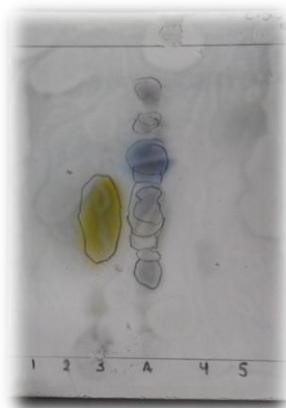


Figura 9. Cromatografía capa fina cloroformo 100%.
A: aceite; 1 a 5 patrones.

Las mezclas de cloroformo-hexano y el cloroformo puro fueron los disolventes que mostraron una mejor separación de los compuestos del aceite. Estos se mostraron muy por encima de solventes más polares como el metanol puro y sus combinaciones con agua y cloroformo.

Con este resultado se realizó una cromatografía en columna para la separación de los componentes de este aceite esencial empleando como fase móvil al hexano y al cloroformo en cantidades crecientes. Se obtuvieron así 90 tubos colectores en serie a los que se concentraron y evaluaron posteriormente en una TLC. Como se presenta en las figuras 10 y 11.

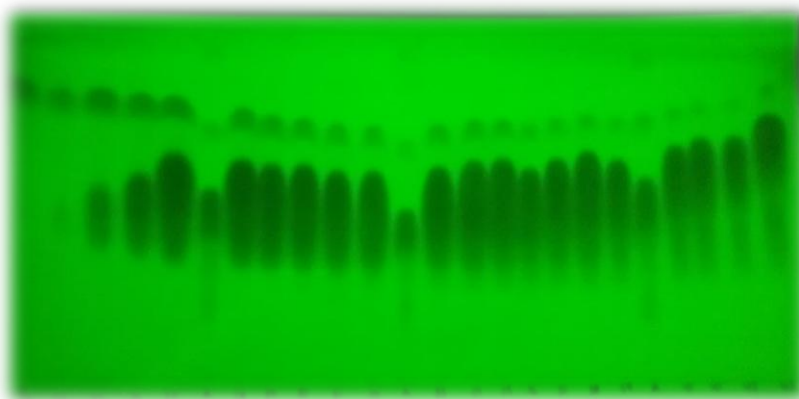


Figura 10. Cromatografía capa fina de la 25 – 43 fracciones
obtenidas de la dilución aceite 1,250mL – cloroformo 1,250mL.

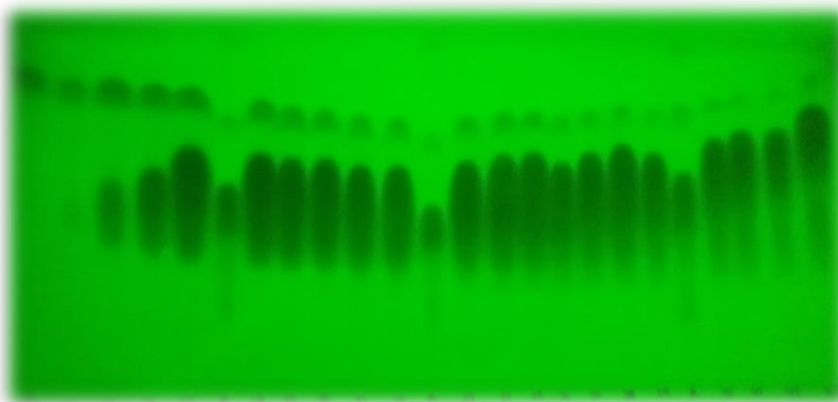


Figura 11. Cromatografía capa fina de la 44 – 66 fracciones
obtenidas de la dilución aceite 1,250mL – cloroformo 1,250mL

Se unieron todos los tubos que presentan un comportamiento similar, resultando entonces en nueve fracciones identificadas con las letras A a I.

Tabla 5. Fracciones obtenidas de la cromatografía del aceite esencial de *M. tomentosa*.

Fracción	Tubo colector	Fase móvil*
A	90	Hexano puro
B	1 al 9	Hexano 75 % + Cloroformo 25 %
C	10 al 23	Hexano 75 % + Cloroformo 25 %
D	24 al 42	Hexano 50 % + Cloroformo 50 %
E	43 al 47	Hexano 50 % + Cloroformo 50 %
F	48 al 75	Hexano 50 % + Cloroformo 50 %
G	76 al 80	Cloroformo puro
H	81 al 85	Cloroformo puro
I	86 al 89	Cloroformo puro

*: indica la fase móvil que fundamentalmente se empleó para el proceso de elusión.

Todas las fracciones anteriores se evaluaron para determinar cuál de ellos presentan una posible actividad antibacteriana.



3.4. Efecto antibacteriano de las fracciones del aceite esencial de *M.tomentosa*.

A continuación se resumen las concentraciones mínimas inhibitorias de las diferentes fracciones frente crecimiento de las bacterias estudiadas.

Tabla 6. CMI50 y CMI90 de las fracciones A-I del aceite esencial de *M.tomentosa*

Fracción	<i>E.coli</i>		<i>S.typhimurium</i>	
	CMI50 (µg/ml)	CMI90 (µg/ml)	CMI50 (µg/ml)	CMI90 (µg/ml)
A	>1000	>1000	>1000	>1000
B	>1000	>1000	>1000	>1000
C	>1000	>1000	>1000	>1000
D	463,0	901,3	646,3	913,3
E	125,0	236,0	276,7	441,7
F	128,0	237,3	265,3	438,0
G	>1000	>1000	>1000	>1000
H	>1000	>1000	>1000	>1000
I	>1000	>1000	>1000	>1000

De estos resultados se deduce que solo las fracciones D, E, F fueron las que presentaron una significativa actividad antimicrobiana frente a los microorganismos analizados.

La comparación estadística de las CIM de los tratamientos con D, E, F y el Linalool sugiere algunos elementos importantes (gráficos 4, 5, 6 y 7).

En primer lugar que este alcohol no es el compuesto con actividad antibacteriana mayoritario en el aceite de *M.tomentosa*, dado que se requiere de mayores



concentraciones para inhibir el crecimiento bacteriano en comparación a las fracciones evaluadas.

En segundo lugar las fracciones E y F poseen los compuestos con mayor actividad antibacteriana ya sea por su estructura o por su concentración en la muestra.

Y en tercer lugar, el comportamiento antibacteriano de las fracciones E y F es similar en cada bacteria analizada, considerándolo como un efecto moderado para las concentraciones requeridas, pudiendo sugerir entonces que podrían tratarse de compuestos químicamente similares. ⁽²⁹⁾

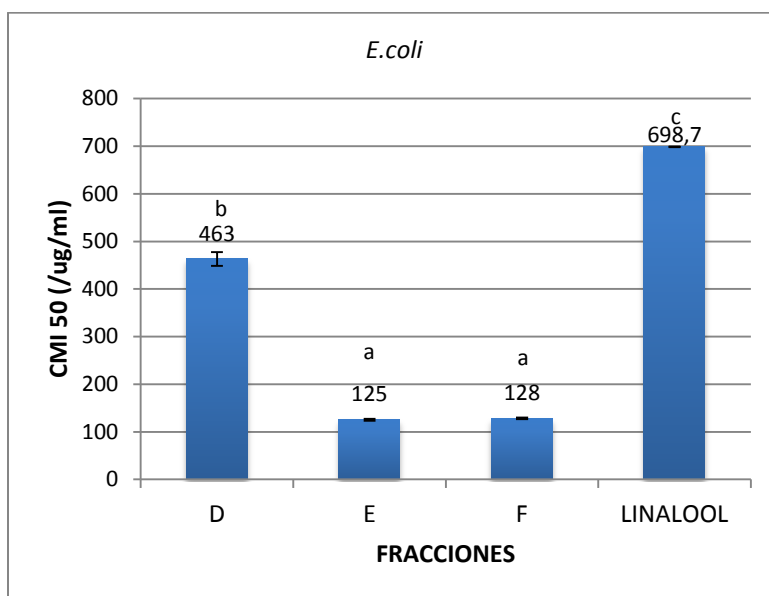


Gráfico 4. Comportamiento de las CMI50 para las fracciones D, E y F y el patrón de Linalool frente a *E.coli*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan.

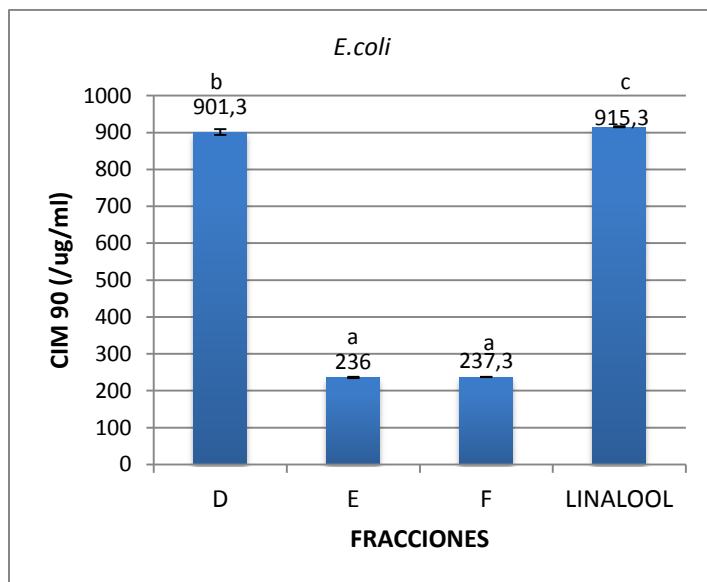


Gráfico 5. Comportamiento de las CMI90 para las fracciones D, E y F y el patrón de Linalool frente a *E.coli*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan.

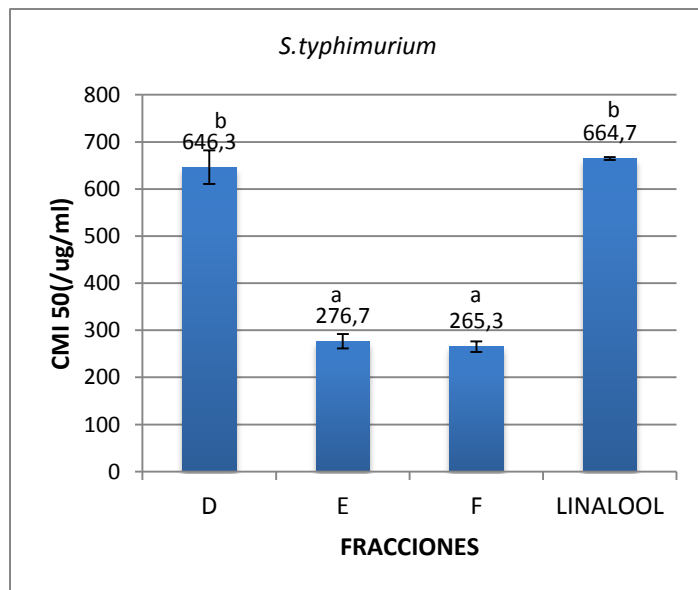


Gráfico 6. Comportamiento de las CMI50 para las fracciones D, E y F y el patrón de Linalool frente a *S.typhimurium*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan.

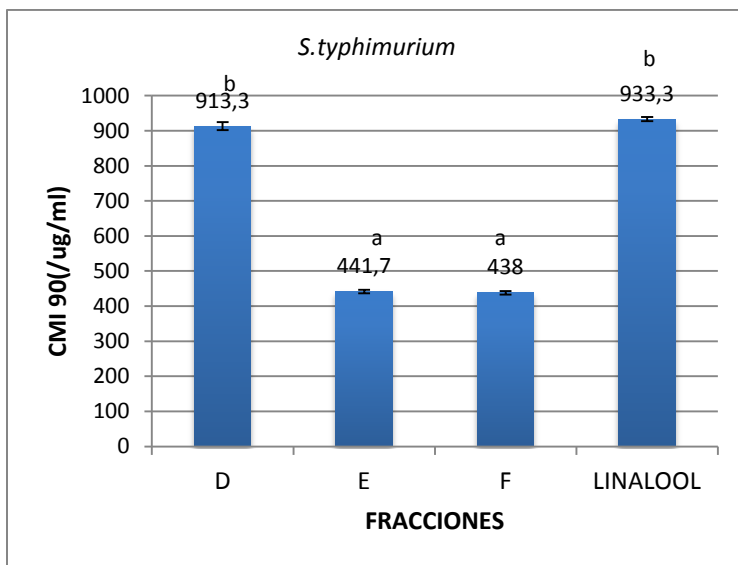


Gráfico 7. Comportamiento de las CMI₉₀ para las fracciones D, E y F y el patrón de Linalool frente a *S. typhimurium*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan.

Por último, al comparar el comportamiento de estas fracciones entre las bacterias analizadas, nuevamente los resultados sugieren que la *E. coli* es más susceptible que *S. typhimurium* a los componentes del aceite esencial de *M. tomentosa* (tabla 7). Esto no ocurrió así para el patrón de linalool, lo que indica nuevamente que si bien este posee actividad antibacteriana, no es el compuesto mayoritario de estas fracciones.



Tabla 7. CMI50 y CMI90 para cada fracción y el patrón de linalool entre las bacterias estudiadas.

TRATAMIENTO	BACTERIA	CMI50				CMI90			
		MEDIA	DS	ET	P	MEDIA	DS	ET	P
D	<i>E.coli</i>	463,0	25,5	14,7	0,009	901,3	13,2	7,6	0,422
	<i>S.typhi</i>	646,3	61,7	35,6		913,3	19,1	11,1	
E	<i>E.coli</i>	125,0	3,5	2	0,001	236,0	2,6	1,5	<0,001
	<i>S.typhi</i>	276,7	6,5	15,3		442,7	8,5	4,9	
F	<i>E.coli</i>	128,0	3	1,7	0,006	237,3	1,2	0,7	<0,001
	<i>S.typhi</i>	265,3	19,7	11,4		438,0	8,2	4,7	
LINALOL	<i>E.coli</i>	698,7	1,2	0,7	0,007	915,3	2,3	1,3	0,044
	<i>S.typhi</i>	664,7	5,7	3,3		933,3	10,5	6,1	

DS: Desviación estándar; ET: error típico de la media; P: probabilidad de error tipo I.

Con el objetivo de identificar cuáles de los constituyentes pudieran ejercer un efecto antibacteriano en estas fracciones se procedió a otro subfraccionamiento de las muestras esta vez por PLC y seleccionar los compuestos con similar movilidad. En este sentido se obtuvieron entonces 3 nuevas subfracciones (enumeradas de 1 a la 3, en la figura 12) que se llevaron posteriormente a una cromatografía de gases.

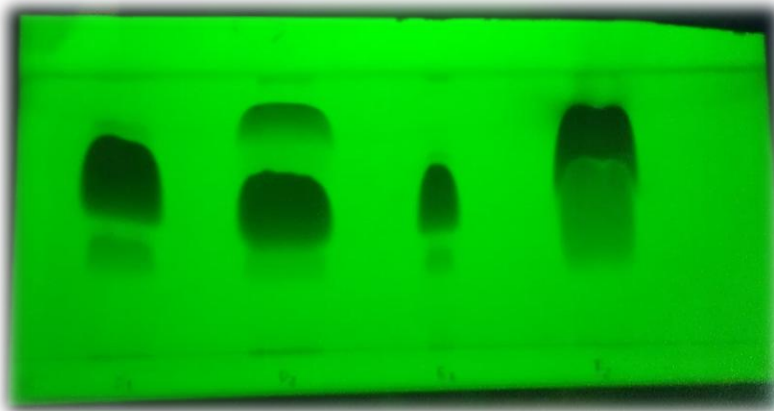


Figura 12. Cromatografía capa fina para obtener las 3 fracciones

La cromatografía de gases identificó nuevamente la presencia de α -pineno, β -pineno y linalool en las subfracciones pero en cantidades muy escasas como para ejercer algún efecto biológicamente notable (Tabla 8).

Tabla 8. Compuestos identificados en las subfracciones 1 a 3 obtenidas de D, E y F.

Compuesto	Área (pA*s)		
	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3
α-pineno	0,3052	-----	-----
β-pineno	-----	0,6601	0,7551
Linalol	0,1325	-----	-----

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación respecto a que los compuestos identificados previamente (α -pineno y β -pineno, limoneno, mentona y linalol) no son los que poseen el mayor poder antibacteriano frente a *E.coli* y *S.typhimurium* en el aceite esencial de *M.tomentosa*.

Lo cual concuerda con estudios previos en otras especies del mismo género que en ellos además de demostrarse la actividad antibacteriana de sus aceites



esenciales contra varios microorganismos, se sugiere que esta puede deberse mayormente a otros compuestos volátiles como la pulegona y el carvacrol, ninguno de los cuales se identificó en la presente investigación por la carencia de patrones para ellos. ⁽³⁰⁾



4. CONCLUSIONES

- 4.1. El aceite esencial de *L.rufocampii* no mostró actividad antibacteriana en los modelos empleados, no así el de *M.tomentosa*.
- 4.2. El aceite de *M.tomentosa* tiene un efecto antibacteriano moderado contra *E.coli* y de moderado a débil frente a *S.typhimurium*.



5. RECOMENDACIONES

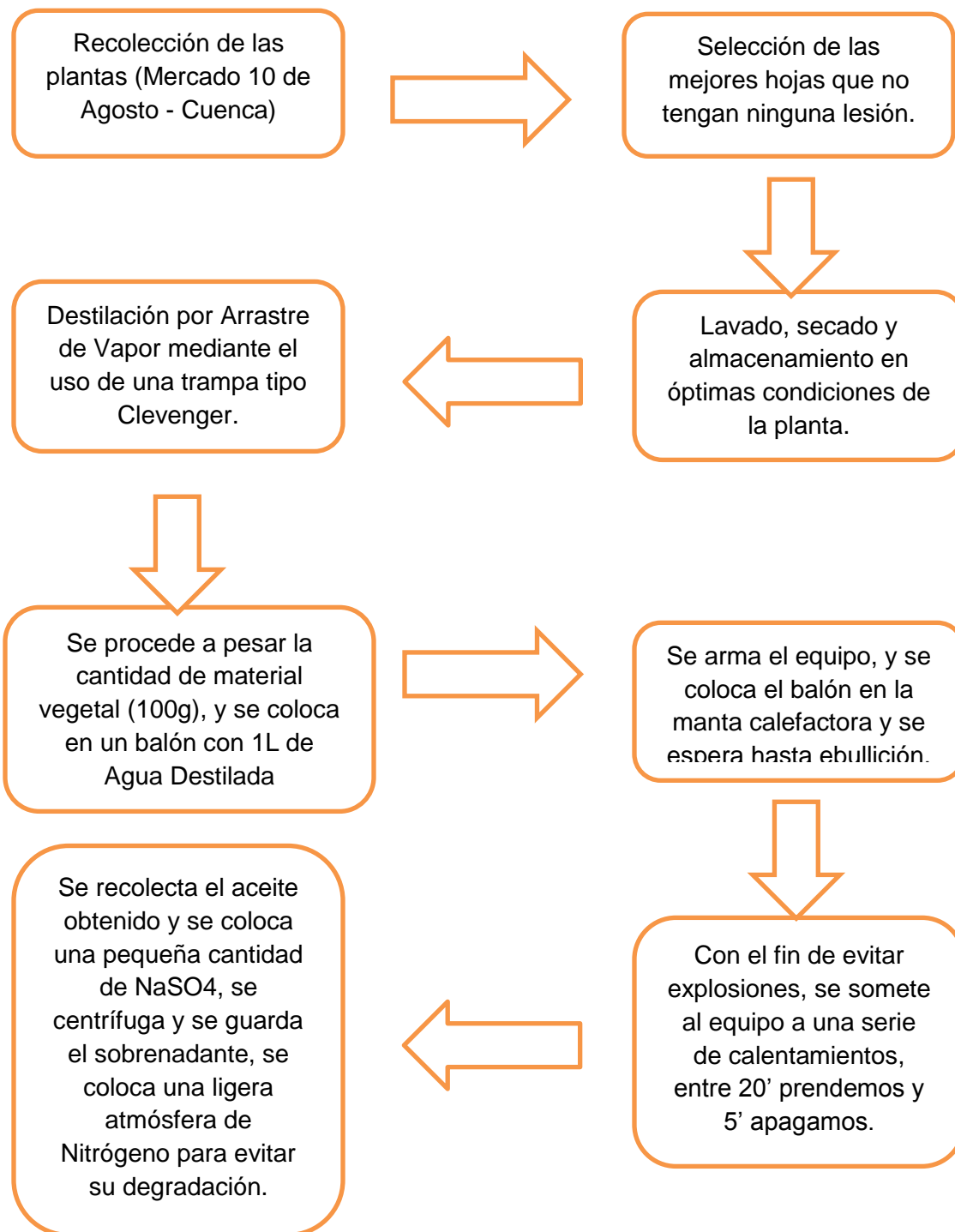
Realizar un estudio más profundo sobre la composición química del aceite esencial de *Minthostachys tomentosa* para identificar cuáles son sus compuestos con actividad antibacteriana.



ANEXOS

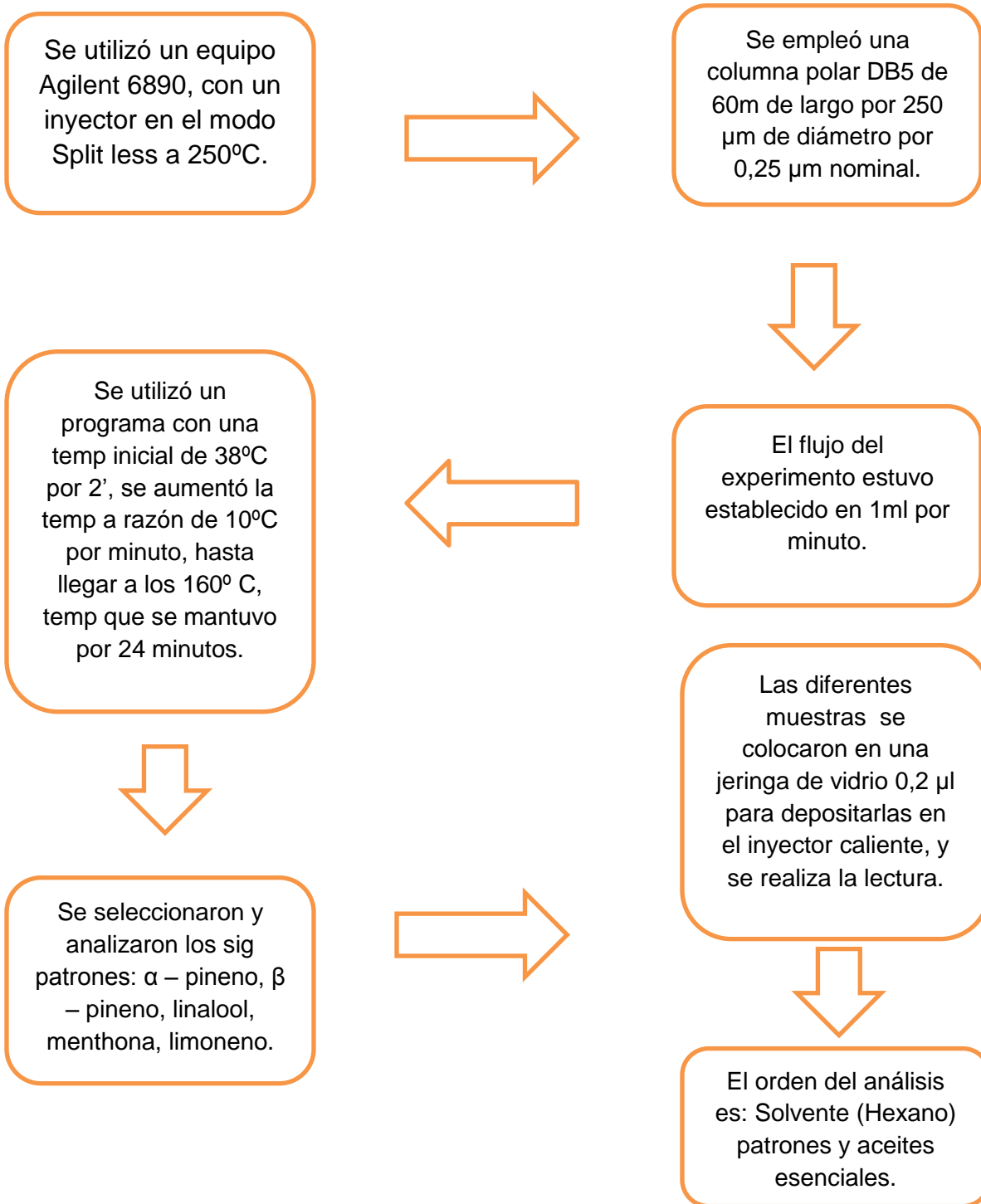


ANEXO 1: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE EXTRACTOS



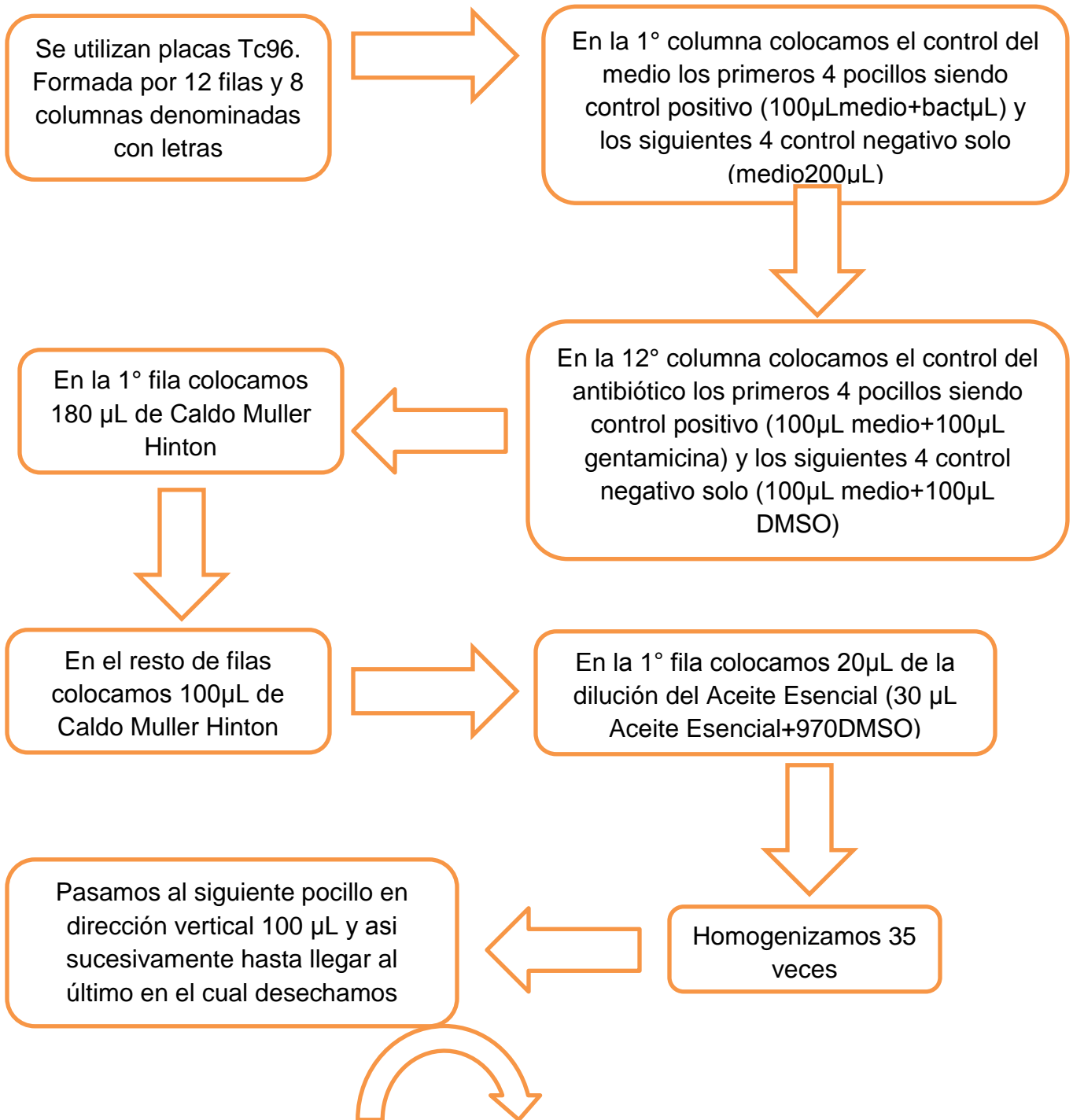


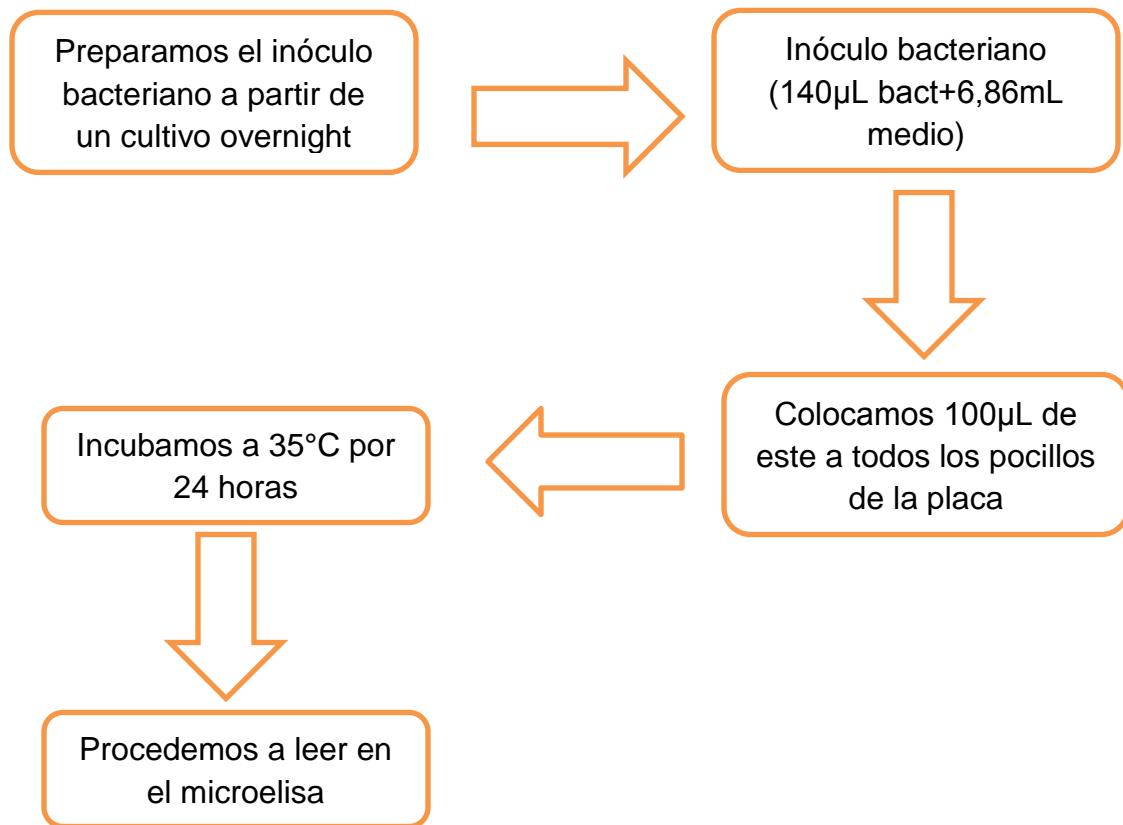
ANEXO 2: PROCEDIMIENTO PARA LA CROMATOGRAFIA DE GASES.





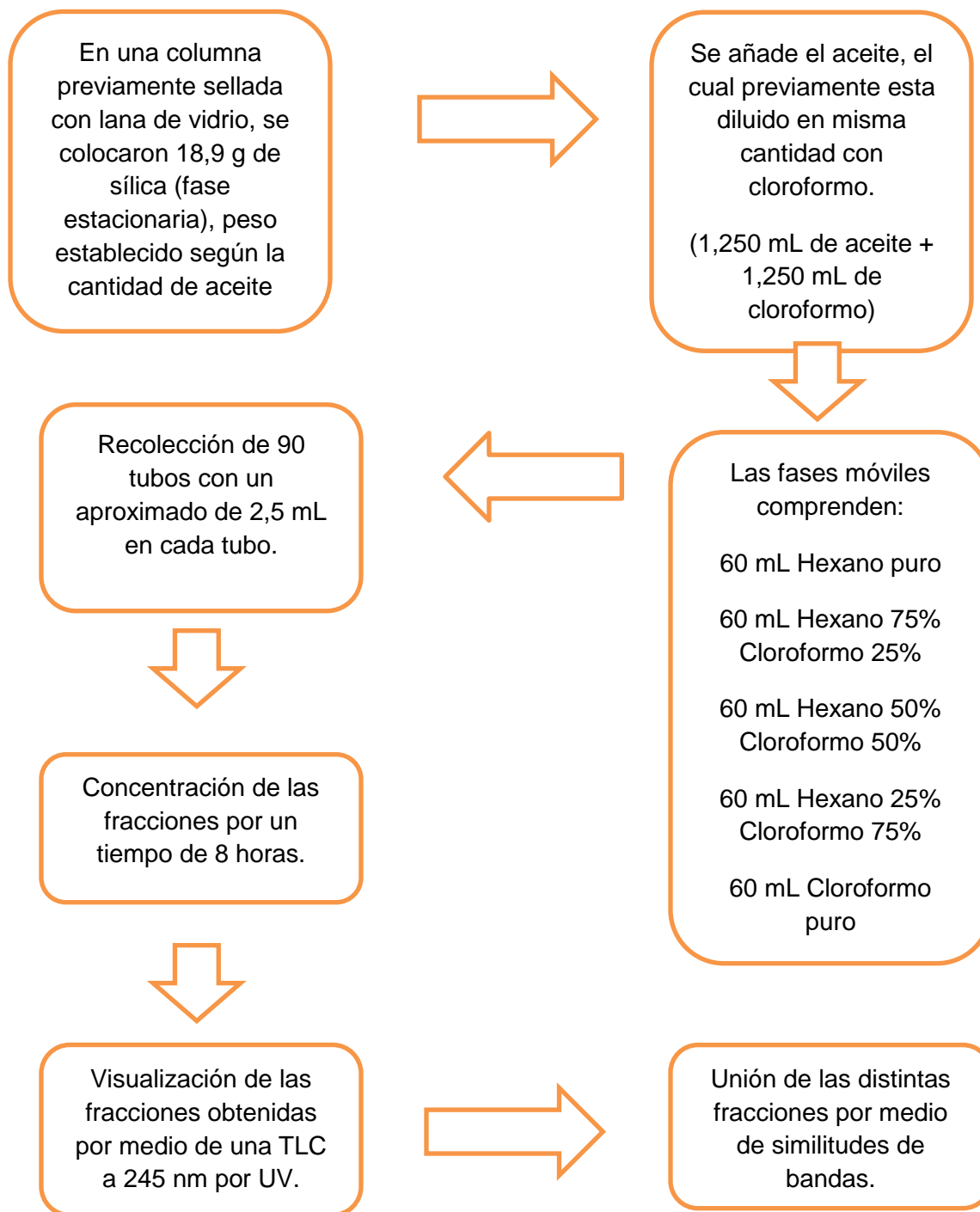
ANEXO 3: Procedimiento para el Screening.







ANEXO 4: PROCEDIMIENTO PARA LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.





BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Poulenard, Pascal Podwojewski y Jérôme. *Los suelos de los páramos del Ecuador*. Quito : Abya Yala, 2000.
2. Vasconez, Patricio Mena. La biodiversidad de los páramos en el Ecuador . [En línea] [Citado el: 22 de Julio de 2013.] www.banrepcultural.org.
3. Nikolai Sharapin. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia : Iberoamericana, 2000.
4. Pública, Ministerio de Salud. Proceso de Control y Mejoramiento de la Salud Pública . *Diez Primeras Causas de Morbilidad* . [En línea] 2007. <http://es.scribd.com/>.
5. José F. Cicció, Victor H. Soto, Luis J. Poveda. Scielo. [En línea] 18 de Marzo de 1999. www.scielo.com.
6. Karen Margarita Saavedra, José Manuel Gómez. Uso medicinal de la Salvia. [En línea] Octubre de 2011. www.tlahui.com/medic.
7. Unheval. Univesidad de Investigación. [En línea] 2009. www.unheval.edu.pe.
8. Poleo. [En línea] Mi jardín secreto . www.mijardinsecreto.cl.
9. M, Alejandro Matínez. Aceites Esenciales. [En línea] Febrero de 2003. www.farmacia.udea.edu.co.
10. Claudia, Kuklinski. *Farmacognosia; Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural* . Barcelona : Omega.
11. Ramirez, Abigail Reyes. Escherichia Coli. [En línea] Junio de 2011. www.uv.mx.
12. J. López Álvarez. Escherichia Coli.[En línea].www.fmvz.unam.mx
13. Salmonella. [En línea] [Citado el: 20 de Mayo de 2013.] www.bvsops.org.uy.
14. UNAM. Destilación por arrastre con vapor . [En línea] Agosto de 2013. www.iocd.unam.mx/organica.
15. Technologies, Agilent. Agilent Technologies 6890 Serie Gas Chromatograph. [En línea] Agilent Technologies, 2000. www.mmrc.caltech.edu/GCMS/6890.



16. Alicante, Universidad de. Cromatografía de Gases. [En línea] www.mncn.csic.es.
17. Armijos, Flora Anabel Arias y Valarezo, Ing Benito Eduardo. Universidad Particular de Loja. [En línea] 2012. www.cepra.utpl.edu.ec.
18. Britania. Caldo Muller Hinton. [En línea] Febrero de 2010. www.britanialab.com.
19. UNICUM. Cromatografía en Capa fina. [En línea] Revista de la Escuela Superior de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Cataluña, 2 de Junio de 2011. [Citado el: 4 de Agosto de 2013.] www.unicum.cat.
20. UNAM. Cromatografía en Columna. [En línea] Diciembre de 2007. [Citado el: 4 de Agosto de 2013.] www.depa.fquim.unam.mx.
21. Ochoa Pumaylle, Luis Paredes Quiroz, Reynaldo Silva Paz. Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil. [En línea] Marzo de 2012. dialnet.unirioja.es.
22. Castillo, Mayra Patricia Ramírez. Extracción por arrastre de vapor y análisis de propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero. [En línea] 10 de Mayo de 2008. <http://catarina.udlap.mx/>.
23. Primo V, Rovera M, Zanon S, Demo M, Oliva M, Sabini L. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Minthostachys verticillata*. [En línea] Junio de 2001. www.ncbi.nlm.nih.gov.
24. Diana del Pilar Guiza, Lina María Rincón. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. [En línea] Octubre de 2007. <http://www.javeriana.edu.co/>.
25. Baik, Jong Seok, Sang Suk Kim, Jung A Lee. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils. [En línea] 2008.
26. Zied Zarai, Ines Ben Chobba, Riadh Ben Mansour. Essential oil of the leaves of *Ricinus communis* L. In vitro cytotoxicity and antimicrobial properties. [En línea] 2012. [Citado el: Septiembre.] www.lipidworld.com.
27. *Antimicrobial Activity of Nutmeg against Escherichia coli*. Akiko Takikawa, Keiko Abe, Makiko Yamamoto. 4, Japan : s.n., 2002, Vol. 94.
28. Mariana Sokovic, Jasmina Glamoclija, Petar. D Marin. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly. [En línea] Molecules, Octubre de 2010. <http://www.mdpi.com/>.



29. Rodrigo L. Fabri, Elaine S. Coimbra, Ana C. Almeida, Ezequias P. Siquiera. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. [En línea] Anais da Academia Brasileira de Ciências, 28 de Marzo de 2012.

30. *Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña Minthostachys setosa*. Guadalupe Chaquilla Quilca¹ Waldir D. Estela Escalante¹ Vinicio Torres Muñoz², María de Lourdes Ballinas. 107, Perú : EciPerú, 2011.